

На правах рукописи

АНАНЬЕВА Пелагея Дмитриевна

**ОЦЕНКА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА
СУКЦИНАТА К СУБСТРАТАМ И МОДУЛЯТОРАМ АКТИВНОСТИ
OATP1B1 *IN VITRO***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Щулькин Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Журавлева Марина Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Воронина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела нейropsychofarmacology Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» ноября 2024 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.3.054.05 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19/38 и на сайте <https://www.rmapo.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Меньшикова Лариса Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нежелательные лекарственные реакции (НЛР) остаются одной из важнейших проблем современной фармакотерапии, причем их распространенность продолжает расти. Так, по данным мировой статистики, в 2019 году было зарегистрировано до 2 миллионов случаев НЛР, более 150 тысяч из них были классифицированы как тяжелые и имели фатальные последствия (Т.С. Литвиненко, 2023; S. Schiek, 2019).

Аналогичная ситуация наблюдается и в России. Анализ федеральной базы данных спонтанных сообщений показал, что с 2009 года ежегодное количество спонтанных сообщений о НЛР постоянно возрастало, достигнув в 2019 году 30 000. Доля серьезных НЛР в общем объеме также неуклонно растет. Так, в 2016 году как серьезные были классифицированы 23% НЛР, в 2017 – 39%, в 2018 – 69% (М.В. Журавлева, 2019). Прием таких препаратов, как β -адреноблокаторы, диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, варфарин, антипсихотики и наркотические анальгетики, продемонстрировал наибольшую частоту ассоциации с развитием НЛР (Д.А. Сычев, 2020; Н. Khalil, 2020).

Частой причиной НЛР становятся межлекарственные взаимодействия. Традиционно их делят на фармакокинетические и фармакодинамические. Одним из уровней, на котором могут развиваться фармакокинетические межлекарственные взаимодействия, является уровень белков-транспортеров (Д.А. Сычев, 2022).

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) относят к клинически значимым транспортерам. Он локализован на базолатеральной мембране гепатоцитов и отвечает за проникновение веществ-субстратов внутрь клеток печени, где происходит их биотрансформация. Транспортер обладает широкой субстратной специфичностью, в частности, отвечает за транспорт статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, блокаторов рецепторов ангиотензина II, сердечных гликозидов, многих антибактериальных и противовирусных лекарственных средств (M. Niemi, 2012).

Ингибирование активности данного переносчика приводит к накоплению его субстрата в крови и возможному развитию НЛР. Так, было описано повышение плазменной концентрации розувастатина в 5-10 раз вследствие ингибирования OATP1B1 циклоспорином (S.G. Simonson, 2004). Учитывая существенную клиническую роль OATP1B1 в межлекарственных

взаимодействиях, основные мировые регуляторные органы рекомендуют тестировать все новые лекарственные препараты на принадлежность к субстратам и ингибиторам данного белка-переносчика с целью повышения безопасности фармакотерапии (European medicines agency, 2012; U.S. Department, 2020, International Council, 2022).

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол®») – препарат с мультитаргетным и полимодальным действием, который был разработан в середине 1980-х годов и доказал свою эффективность в многочисленных клинических исследованиях (Т.А. Воронина, 2019; Л.В. Стаховская, 2020; В.В. Захаров, 2022). ЭМГПС обладает выраженным антигипоксическим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим и нейропротекторным эффектами, а также рядом других, что позволяет применять его при широком спектре нозологий и у коморбидных пациентов (Т.А. Воронина, 2019; А.Б. Мовсисян, 2022; И.А. Грибачева, 2023). Учитывая данные обстоятельства, ЭМГПС часто назначается совместно с другими лекарственными веществами, что может приводить к возникновению межлекарственных взаимодействий. Для повышения безопасности проводимой комбинированной терапии и прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий необходимо точно знать, какие белки-транспортеры принимают участие в фармакокинетике препарата.

Таким образом, оценка принадлежности ЭМГПС к субстратам и модуляторам белка-транспортера OATP1B1 представляется важной и актуальной задачей фармакологии, решению которой посвящена настоящая работа.

Степень разработанности темы исследования

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – оригинальный отечественный антиоксидант и антигипоксикант (Т.А. Воронина, 2019; А.И. Федин, 2021; В.В. Захаров, 2022). В ходе проведения доклинических и клинических исследований было показано, что ЭМГПС быстро всасывается и достигает максимальной концентрации в среднем через 30 мин. Исследуемое вещество равномерно распределяется по органам и тканям, проникая в головной мозг через гематоэнцефалический барьер (А.В. Щулькин, 2014). В ходе биотрансформации ЭМГПС было идентифицировано 5 метаболитов: 3-оксипиридина фосфат, 2-метил-6-метил-3-оксипиридин, 6-метил-3-оксипиридин, конъюгат 2-метил-6-метил-3-оксипиридина с глюкуроновой кислотой, конъюгат 3-гидрокси-6-метил-

2-этилпиридина фосфата с глюкуроновой кислотой (А.К. Сариев, 1999). Основное количество лекарственного вещества выводится почками в виде глюкороноконъюгата в первые 4 часа (А.К. Сариев, 1999). Показано, что ЭМГПС повышает активность изоформы 3A4 цитохрома P450 (П.А. Баранов, 2010).

На базе кафедры фармакологии Рязанского государственного медицинского университета в течение более 10 лет успешно выполняются исследования по оценке принадлежности различных лекарственных препаратов к субстратам и модуляторам клинически значимых белков-транспортёров. Были разработаны и валидированы методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам Р-гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы (Щулькин А.В., 2019; П.Ю. Мыльников, 2021; Ю.С. Транова, 2023).

С помощью разработанных подходов был протестирован ряд лекарственных препаратов: фабомотизол, омберацетам, вилдаглиптин, тиамазол, финастерид и др. (Е.Н. Якушева, 2012; И.В. Черных, 2013; Е.Н. Якушева, 2016). В частности, установлено, что ЭМГПС не является субстратом Р-гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы, но ингибирует активность данных транспортёров (П.Ю. Мыльников, 2021, Ю. Транова, 2023).

ОАТР1В1 является клинически значимым транспортёром, обеспечивающим проникновение субстратов внутрь гепатоцитов, где в дальнейшем происходит их биотрансформация. Снижение активности ОАТР1В1, например, вследствие межлекарственных взаимодействий, является одной из причин развития статин-индуцированной миопатии (статины являются субстратами ОАТР1В1) в результате повышения их концентрации в плазме крови (Y. Shitara, 2011; X. Han, 2015; T. Hirota, 2020).

Несмотря на достаточное число исследований, посвященных изучению эффектов и клинического применения ЭМГПС, принадлежность ЭМГПС к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 (ОАТР1В1) остается неизученным разделом, что и определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Определить принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 (ОАТР1В1) *in vitro* и оценить его участие в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Задачи исследования

1. Разработать рекомбинантную линию клеток, гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (НЕК293-ОАТР1В1).
2. Разработать методику оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам ОАТР1В1 с помощью созданной рекомбинантной клеточной линии.
3. Разработать и валидировать методики количественного определения аторвастатина и этилметилгидроксипиридина в лизате клеток с помощью ВЭЖХ-МС/МС.
4. Протестировать этилметилгидроксипиридина сукцинат на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам ОАТР1В1 и оценить его участие в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортера.

Научная новизна исследования

Разработана первая в России рекомбинантная линия клеток, гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (ОАТР1В1).

Налажена и апробирована методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам ОАТР1В1 с помощью клеточных линий НЕК293-ОАТР1В1 и HepG2. Установлено, что данная методика позволяет прогнозировать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортера.

Разработаны и валидированы ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения этилметилгидроксипиридина и аторвастатина в образцах лизатов клеток. Установлено, что данные методики являются высокочувствительными, что позволяет использовать их в биоаналитических исследованиях.

Оценена принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и ингибиторам транспортера ОАТР1В1.

Расширены представления об участии этилметилгидроксипиридина сукцината в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. Доказано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат может безопасно комбинироваться в клинической практике с субстратами и ингибиторами ОАТР1В1 и не вступает с ними в фармакокинетические межлекарственные взаимодействия.

Получены новые данные о влиянии этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество ОАТР1В1.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработана технология создания рекомбинантных клеточных линий, селективно гиперэкспрессирующих клинически значимые белки-транспортёры.

С помощью данной технологии создана клеточная линия, селективно гиперэкспрессирующая ОАТР1В1 (НЕК293-ОАТР1В1).

С применением клеток НЕК293-ОАТР1В1 налажена методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам ОАТР1В1.

Показано, что оригинальный отечественный антиоксидант и антигипоксикант ЭМГПС не является субстратом ОАТР1В1, не влияет на количество транспортера, однако ингибирует его активность в высоких концентрациях (существенно выше плазменных). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС является безопасным в плане развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне ОАТР1В1, то есть может длительно совместно применяться с субстратами/ингибиторами данного транспортера.

Установлено, что изменение экспрессии гена *SLCO1B1* не является ведущим механизмом регуляции ОАТР1В1, так как гиперэкспрессия гена не приводит к эквивалентному увеличению уровня белка.

Разработаны методики ВЭЖХ-МС/МС анализа ЭМГП и аторвастатина. Они являются чувствительными, селективными, точными и прецизионными и пригодны для количественного определения данных веществ в биологических образцах.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено *in vitro*.

Для создания рекомбинантной клеточной линии использовались клетки линии НЕК293. С помощью методов генной инженерии конструировали плазмиду с геном *SLCO1B1* (англ.: *Solute carrier organic anion transporter family member 1B1*), кодирующим транспортер ОАТР1В1, затем с помощью липофектамина 3000 проводили трансфекцию клеток и селекцию полученных клонов. В полученной клеточной линии (НЕК293-ОАТР1В1) с помощью метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени подтверждали экспрессию гена *SLCO1B1*, методом

вестерн-блот оценивали количество изучаемого белка. Активность ОАТР1В1 в рекомбинантной клеточной линии определяли по проникновению классического субстрата транспортера аторвастатина внутрь клеток, концентрацию которого детектировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Принадлежность ЭМГП к субстратам ОАТР1В1 анализировали с помощью сравнения его проникновения в клетки НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1, а концентрацию тестируемого вещества детектировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Влияние ЭМГПС на активность ОАТР1В1 оценивали по изменению проникновения субстрата транспортера аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1.

Влияние ЭМГПС на экспрессию гена *SLCO1B1* анализировали в клетках НерG2 методом ПЦР в реальном времени, на количество белка ОАТР1В1 – методом вестерн-блот.

Для подтверждения полученных результатов об ингибировании ЭМГПС активности ОАТР1В1 выполняли аналогичные эксперименты на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы – НерG2, экспрессирующей ОАТР1В1.

Клиническую значимость полученных результатов оценивали с помощью подхода международных регуляторных организаций (FDA, EMA) с расчетом отношения C_{max} (максимальная концентрация ЭМГПС в плазме крови пациентов) к IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) ЭМГПС, установленной в выполненных экспериментах *in vitro*.

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США). Данные в работе представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение (SD). Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннетта при сравнении более чем двух групп и непарного t-критерия Стьюдента при сравнении двух групп. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Кинетические параметры K_m (константа Михаэлиса) и V_{max} (максимальная скорость поглощения) рассчитывали с использованием уравнения конкурентного ингибирования.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование разработанной и апробированной в ходе исследования методики тестирования лекарственных веществ на

принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, позволяет прогнозировать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортера.

2. Предложенные оптимизированные и валидированные ВЭЖХ-МС/МС методики детекции этилметилгидроксипиридина и аторвастатина пригодны для их быстрого и точного количественного определения в биологических образцах.

3. Этилметилгидроксипиридин не является субстратом и клинически значимым ингибитором полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, поэтому не участвует в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне транспортера OATP1B1.

Степень достоверности исследования

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных на клетках *in vitro* с использованием адекватных и современных методов исследований (генной инженерии, микроскопии, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, вестерн блот, высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием) с последующей систематизацией и статистической обработкой. Степень достоверности проведенного исследования подтверждается использованием современных, адекватных и корректных методик обработки полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения – «Statsoft Statistica 13.0» (США) и GraphPad Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США).

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах Студенческого биохимического форума – 2023 (Москва, 2023); VIII Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань, 2022); XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022); 25-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2022); 26-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023);

Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины МГУ (Москва, 2023).

Апробация работы состоялась 25 декабря 2023 года на совещании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии; биологии; фармацевтической химии и фармакогнозии; управления экономики и фармации, фармацевтической технологии (Протокол №1 от 25.12.23).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедре фармакологии института фармации и медицинской химии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Протокол №1 от 28.08.23), в работе лаборатории клеточных технологий НЦИЛС ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России» (Акт внедрения от 17.11.2023), в работе ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова Минздрава России» (Акт внедрения от 01.09.2023).

Личный вклад автора

Автору принадлежит основная роль на всех этапах исследования. Автор самостоятельно выбрал тему диссертационного исследования, изучил литературу по тематике исследования и подготовил обзор литературы по направлению темы диссертационной работы. Автор принимал непосредственное участие в разработке методологии и определении необходимых методов исследования. Автор лично провел эксперименты *in vitro*, выполнил молекулярно-генетические (ПЦР-анализ), масс-спектрометрические (ВЭЖХ-МС/МС) исследования, а также исследования методом вестерн-блот. Автор самостоятельно провел обработку и интерпретацию полученных в ходе исследования результатов и подготовил текст диссертации. Автор самостоятельно подготовил и опубликовал научные работы по результатам диссертационного исследования, а также внедрил их в образовательный и рабочий процесс. Результаты исследования были доложены автором лично на конференциях различного уровня.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту

специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки) и соответствующим направлениям исследований: п. 6. Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека; п. 9. Изучение взаимодействия лекарственных средств, разработка наиболее рациональных комбинаций при проведении современной фармакотерапии.

Публикации по теме диссертации

По теме исследования опубликовано 6 печатных работ, отражающих основные результаты диссертации, в т.ч. 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций, из которых в журналах, включенных в международные базы данных SCOPUS и Web of Science – 4 статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 119 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы исследования, глава 3 – результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами. Список литературы представлен 178 источниками, включая 57 источников отечественной и 121 источник зарубежной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено *in vitro* на клеточных линиях HEK293, HEK293-OATP1B1 и HepG2. Клетки культивировали при температуре 37°C и 5% CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, Германия), с добавлением L-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich, Германия), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия) соответственно.

Ген *SLCO1B1* (Gene ID:10599, NCBI Reference Sequence: NM_006446.5) был получен путем синтеза (Atagenix, Китай) и клонирован по сайтам XhoI

и HindIII в линейризованный вектор pEGFP-N1 (Clontech, Китай) путем безлигазного клонирования с Т4 ДНК-полимеразой, в результате чего была получена плаزمида pEGFP-SLCO1B1. Адекватность последовательности в клонированном гене была подтверждена методом секвенирования. Целевой ген был клонирован в вектор pEGFP-N1 в одной рамке считывания с геном, кодирующим EGFP (*англ.: Enhanced Green Fluorescent Protein*) на С-конце. Поскольку ген EGFP находился в той же рамке считывания, что и таргетный ген, появление флуоресценции в трансфицированных клетках указывало на экспрессию *SLCO1B1*.

Клетки линии HEK293 подвергались процедуре трансфекции плазмидой pEGFP-SLCO1B1 методом липофекции с использованием Lipofectamine™ 3000 Reagent (Invitrogen, США). Через 48 часов экспрессия GFP анализировалась с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония). Для получения клонов HEK293-OATP1B1, стабильно экспрессирующих OATP1B1, была проведена селекция с использованием антибиотика G-418 (генетицин) (Promega, США) в концентрации 500 мкг/мл.

Мембранная локализация OATP1B1 оценивалась с помощью конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Nikon TE2000-U, оснащенного конфокальной сканирующей системой DCS-120 с детектором PMC-100 Becker&Hickl (Nikon, Германия). Экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной линии клеток была подтверждена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (для *SLCO1B1*: прямой праймер 5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGAG-3', обратный праймер 5'-TGGAACCCAGTGCAAGTGATT-3'; для *GAPDH*: прямой праймер 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3', обратный праймер 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'). Метод вестерн-блот использовался для доказательства наличия OATP1B1 в созданной линии клеток (HEK293-OATP1B1) (для OATP1B1: первичные антитела - OATP2 Polyclonal Antibody (Invitrogen, США), 1:2000, вторичные антитела - Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США), 1:4000; для *GAPDH*: первичные антитела - GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (Invitrogen, США), 1:1000; вторичные антитела - Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США), 1:4000).

Активность OATP1B1 в клетках HEK293-OATP1B1 исследовалась по проникновению в клетки субстрата белка-транспортера аторвастатина

(Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации 1 мкМ. Для подавления функциональной активности OATP1B1 был использован классический ингибитор транспортера – рифампицин в концентрации 100 мкМ (Shitara Y., 2011; Baillie T. A., 2008). Количество аторвастатина в лизате клеток анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Для оценки принадлежности ЭМГП к субстратам OATP1B1 было оценено проникновение ЭМГП в концентрации 10 мкМ в клетки линии HEK293 и HEK293-OATP1B1. Количество ЭМГП в образцах определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для изучения влияния ЭМГПС на активность OATP1B1 анализировали проникновение аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 и HepG2 в присутствии и отсутствие ЭМГПС (1-500 мкМ). В качестве позитивного контроля ингибирования использовался рифампицин (1-500 мкМ).

Для оценки влияния ЭМГПС на экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество OATP1B1 тестируемое вещество в концентрациях 1, 10, 100 и 500 мкМ добавляли к клеткам линии HepG2 и инкубировали в течение 24 часов. Экспрессию гена *SLCO1B1* в образцах оценивали методом ПЦР в реальном времени, относительное количество OATP1B1 – с помощью вестерн-блот. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннетта при сравнении более, чем двух групп и непарного t-критерия Стьюдента при сравнении двух групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка рекомбинантной клеточной линии, гиперэкспрессирующей полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1)

Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидой pEGFP-SLCO1B1. OATP1B1 экспрессировался в виде белка, слитого с EGFP на C-конце. При конфокальной микроскопии отмечалась преимущественно мембранная локализация EGFP, что указывало на встраивание OATP1B1 в клеточную мембрану (Рисунок 1).

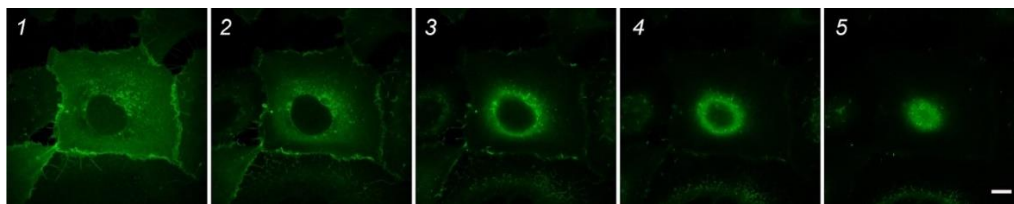


Рисунок 1 – Флуоресценция клеток линии HEK293-OATP1B1

Результаты ОТ-ПЦР в реальном показали, что количество мРНК *SLCO1B1* в созданной клеточной линии HEK293-OATP1B1 существенно превышало данный показатель в нативных клетках HEK293 (Рисунок 2).

Относительное количество белка OATP1B1 в лизатах клеток оценивали методом вестерн-блот. Интактные клетки линии HEK293 (рисунок 2, дорожка 4) не содержали OATP1B1, в отличие от образцов клеток линии HEK293-OATP1B1 (дорожки 1-3). Бэнд образцов из HEK293-OATP1B1 располагался на 30 кДа выше, чем бэнд образцов клеток линии HepG2 (дорожка 5), которые использовались в качестве позитивного контроля, что свидетельствует о том, что OATP1B1 синтезировался в виде слитого с EGFP (28 кДа) белка.

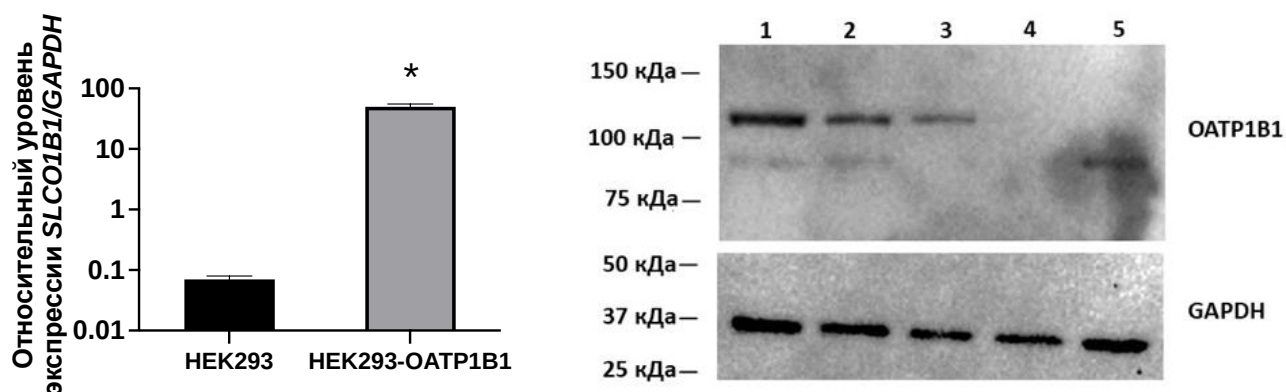


Рисунок 2 – Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* и относительное количество OATP1B1 в клетках линий HEK293 и HEK293-OATP1B1

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с показателями клеток HEK293, $p < 0,05$.

Таким образом, в ходе работы была создана рекомбинантная клеточная линия, которая селективно и стабильно экспрессировала транспортер OATP1B1.

Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина

Концентрацию аторвастатина в смеси лизатов клеток линий HEK293 и HepG2 анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью хроматографа «Ultimate 3000» и масс-спектрометра TSQ Fortis (ThermoFisher, США).

Клетки лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки. Для извлечения аторвастатина к 300 мкл лизата клеток добавляли 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом (валсартан 10 нг/мл).

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 5 um, 100 Å, термостатирование колонки 35 °C. В работе был применен градиентный режим элюирования, соотношения раствора А – 0,1% кислоты муравьиной и раствора В – ацетонитрила было следующим: 0,0 мин – 35% / 65%, 0,3 мин – 35% / 65%, 0,6 мин – 5% / 95%, 5,0 мин – 5% / 95%, 5,05 мин – 35% / 65%, 8,0 мин – 35% / 65%. Скорость потока – 0,3 мл/мин, пробы вводились в хроматограф в объеме 2 мкл. Анализ проводился в течение 10 мин. При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 4,53 мин, валсартана – 4,45 мин. Молекулы ионизировали при положительном электроспрее при напряжении 3500 В. Детектирование выполняли в режиме MRM, анализировали следующие переходы: аторвастатин – 559,30 m/z → 466,20 m/z (*-использовался для количественного анализа), 559,30 m/z → 440,20 m/z; валсартан 436,2 m/z → 206,3 m/z*, 436,2 m/z → 234,9 m/z.

Предел обнаружения аторвастатина составил 0,16 нмоль/л, нижний предел количественного определения – 0,5 нмоль/л. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $Y = -0,0517995 + 0,191819 \cdot X$, $R^2 = 0,9913$, $1/X^2$; $Y = -0,034411 + 0,19056 \cdot X$, $R^2 = 0,9917$, $1/X^2$; $Y = -0,0431565 + 0,197431 \cdot X$, $R^2 = 0,9937$, $1/X^2$. Рассчитанные коэффициенты корреляции составили не менее 0,99, что соответствует принятым нормам. Внутрицикловая точность и прецизионность методики находились в пределах допустимых значений (<15% для основных контролей качества – 2, 100 и 150 нмоль/л, <20% – для НПКО). Стабильность растворов аторвастатина была подтверждена при хранении при -80°C в течение 60 сут, при трехкратном цикле заморозки-разморозки, в атосемплере при +4°C в течение 24 ч. Матричный эффект аторвастатина при 2 нмоль/л составил 93,0±3,6%, при 150 нмоль/л – 94,3±4,4%, эффект извлечения 95,4±2,4% и 96,6±2,5%, соответственно.

Разработка методики оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам OATP1B1 с помощью рекомбинантной клеточной линии HEK293-OATP1B1

Оценивалась скорость транспорта аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 в зависимости от концентрации субстрата (1, 5, 10 и 50 мкМ) при длительности эксперимента 5 мин. Полученные результаты представлены на рисунке 3. В ходе исследования было установлено, что скорость проникновения аторвастатина постепенно нарастает с увеличением концентрации и выходит на плато при концентрации 10 мкМ. При расчете константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакции при насыщении фермента субстратом (V_{max}) были получены следующие результаты: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ, $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹ (Рисунок 3).

На основании полученных данных в дальнейшем исследовании использовалась концентрация аторвастатина 1 мкМ, как концентрация ниже насыщающей.

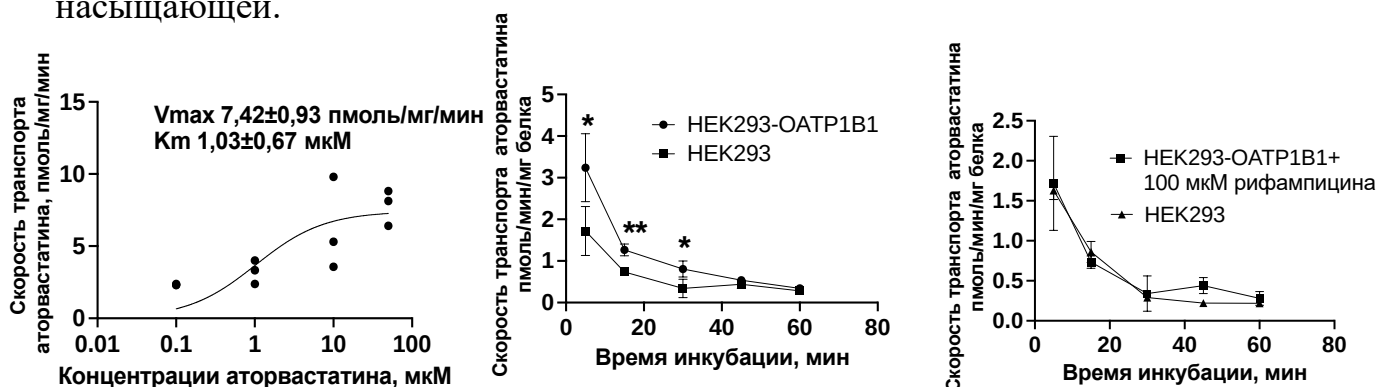


Рисунок 3 – Зависимость проникновения аторвастатина внутрь клеток HEK293-OATP1B1 от его концентрации и длительности инкубации, пмоль/мг/мин

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями клеток HEK293.

Затем была оценена скорость проникновения аторвастатина в зависимости от длительности инкубации – 5, 15, 30, 45 и 60 минут. Максимальная скорость проникновения аторвастатина в клетки отмечалась через 5 мин от начала инкубации, затем она постепенно снижалась и выходила на плато к 45-60 минуте (Рисунок 3). На основе полученных данных была выбрана длительность эксперимента 5 мин, как срока с максимальной скоростью транспорта.

На заключительном этапе было выполнено сравнение скорости проникновения аторвастатина в интактные клетки HEK293 и клетки HEK293- OATP1B1, а также влияние ингибитора транспортера –

рифампицина в концентрации 100 мкМ на скорость проникновения аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1.

Проникновение аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 во временных точках эксперимента 5, 15 и 30 минут достоверно превышало проникновение субстрата в интактные клетки НЕК293. Рифампицин в концентрации 100 мкМ снижал транспорт аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 до уровня интактных НЕК293 во всех временных точках эксперимента (Рисунок 3).

Разработка и валидация методики количественного определения ЭМГП в лизате клеток

Концентрацию ЭМГП в смеси лизатов клеток анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью хроматографа «Ultimate 3000» и масс-спектрометра TSQ Fortis (ThermoFisher, США). Клетки лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки. Для извлечения ЭМГП к 300 мкл лизата клеток добавляли 300 мкл метанола с внутренним стандартом (амантадин 10 нг/мл).

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 3 μm, 100 Å, термостатирование колонки 40 °C. В работе был применен градиентный режим элюирования, соотношения раствора А – метанол, раствора В – 0,1% кислоты муравьиной было следующим: 0,0 мин – 10% / 90%, 0,01 мин – 30% / 70%, 3,5 мин – 50% / 50%, 3,5 мин – 90% / 10%, 5,0 мин – 90% / 10%, 5,0 мин – 10% / 90%, 7,5 мин – 10% / 90%. Скорость потока – 0,5 мл/мин, пробы вводились в хроматограф в объеме 10 мкл. Анализ проводился в течение 7,5 мин. При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 3,69-3,9 мин, амантадина – 5,7-6,07 мин. Молекулы ионизировали при положительном электроспрее при напряжении 3500 В. Детектирование выполняли в режиме MRM, анализировали следующие переходы: ЭМГП – 138,1 m/z → 123 m/z*, 138,1 m/z → 94,08 m/z, амантадин 152,1 m/z → 135,08 m/z*, 152,1 m/z → 79,08 m/z.

Предел обнаружения ЭМГП составил 0,03 нмоль/л, нижний предел количественного определения – 0,1 нмоль/л. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $Y = 0,258989 + 0,13312 \cdot X$, $R^2 = 0,9990$, $1/X$, $Y = 0,213448 + 0,127991 \cdot X$, $R^2 = 0,9997$, $1/X$, $Y = 0,222422 + 0,130872 \cdot X$, $R^2 = 0,9967$, $1/X$. Рассчитанные коэффициенты корреляции составили не менее 0,99, что соответствует принятым нормам. Внутрицикловая точность и

прецизионность методики находились в пределах допустимых значений ($<15\%$ для основных контролей качества – 0,3, 30 и 50 нмоль/л, $<20\%$ – для НПКО). Стабильность растворов ЭМГПС была подтверждена при хранении при -80°C в течение 60 сут, при трехкратном цикле заморозки-разморозки, в атосемплере при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Матричный эффект ЭМГП при 0,3 нмоль/л составил $93,8 \pm 3,9\%$, при 50 нмоль/л – $95,3 \pm 2,2\%$, эффект извлечения $96,6 \pm 9,9\%$ и $95,7 \pm 1,1\%$ соответственно.

Оценка принадлежности ЭМГП к субстратам OATP1B1

Для оценки участия OATP1B1 в транспорте ЭМГП сравнивали проникновение анализируемого вещества в клетки линии HEK293-OATP1B1 и HEK293. Не было зарегистрировано статистически значимых различий в проникновении 10 мкМ ЭМГП в клетки HEK293-OATP1B1 и HEK293 в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут инкубации (Рисунок 4).

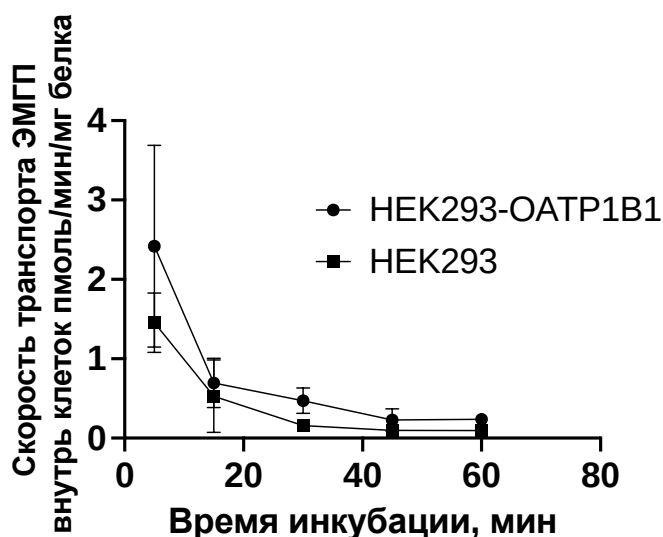


Рисунок 4 – Скорость транспорта 10 мкМ ЭМГП внутрь клеток HEK293-OATP1B1 и HEK293 (пмоль/мин/мг белка)

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМГП не является субстратом OATP1B1.

Оценка влияния ЭМГПС на активность OATP1B1 в клетках линии HEK293-OATP1B1

ЭМГПС дозозависимо ингибировал проникновение 1 мкМ аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 во всех протестированных концентрациях (1-500 мкМ) со значением IC_{50} $12,1 \pm 7,64$ мкМ. Рифампицин оказывал аналогичное действие, IC_{50} составила $2,51 \pm 1,35$ мкМ. При этом в

концентрациях 5-100 мкМ по ингибирующей активности рифампицин превосходил ЭМГПС.

При оценке влияния сукцината на проникновение аторвастатина внутрь клеток было показано, что во всех протестированных концентрациях он достоверного эффекта на изучаемый показатель не оказал (Таблица 1). Таким образом, ЭМГПС ингибирует активность ОАТР1В1 за счет наличия ЭМГП в его молекуле, однако, по своей ингибирующей активности он уступает классическому ингибитору ОАТР1В1 – рифампицину.

Таблица 1 – Влияние ЭМГПС, рифампицина и сукцината на проникновение аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 (пмоль/мин/мг белка; $M \pm SD$; $n=3$)

	ЭМГПС	Рифампицин	Янтарная кислота
Контроль	6,27±0,57		
1 мкМ	4,56±0,53*	4,35±0,34***	5,83±0,57
5 мкМ	4,21±0,57**	2,54±0,70***#	6,39±0,52
10 мкМ	3,48±0,69**	1,06±0,16***#	5,0±0,70
100 мкМ	2,21±0,62***	0,55±0,24***#	5,97±0,47
500 мкМ	0,60±0,22***	0,30±0,17***	5,33±0,66

Примечания: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – статистически значимые различия с показателями контроля; # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия между ЭМГПС и рифампицином.

*Оценка влияния ЭМГПС на экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество ОАТР1В1 на клетках линии НерG2*

Для оценки влияния ЭМГПС на экспрессию мРНК *SLCO1B1* и на относительное количество белка ОАТР1В1 клетки НерG2 инкубировали с тестируемым веществом в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ (Рисунок 5).

В ходе исследования было показано, что ЭМГПС во всех протестированных концентрациях повышал экспрессию мРНК *SLCO1B1*, однако, не влиял на относительное количество ОАТР1В1 (Рисунок 5).

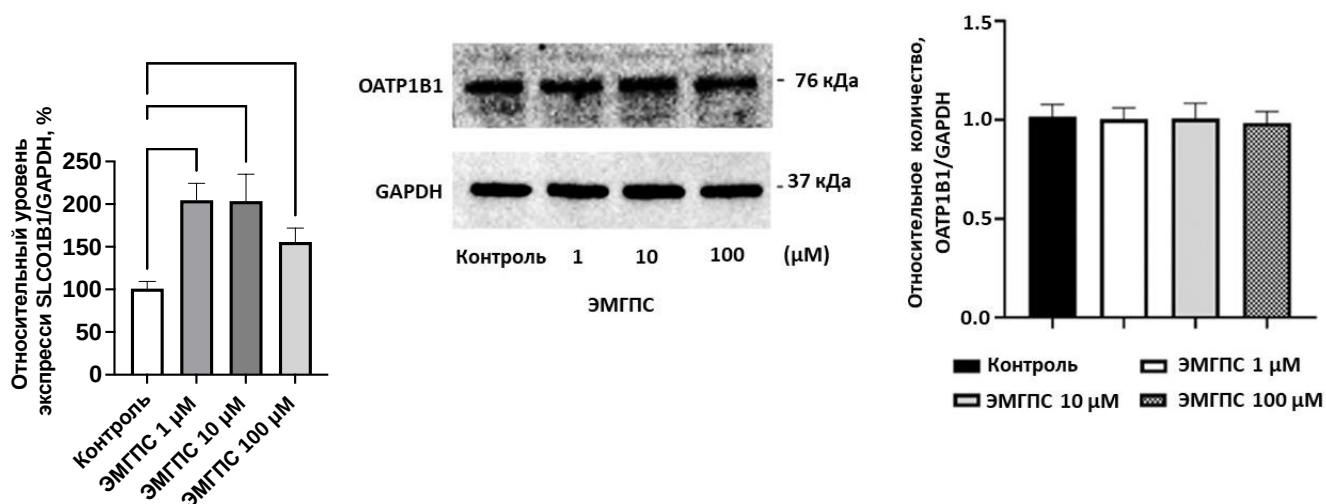


Рисунок 5 - Влияние ЭМГПС на экспрессию *SLCO1B1* и относительное количество ОАТР1В1 в клетках НерG2 (%)

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля.

Оценка влияния ЭМГПС на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2

На завершающем этапе были выполнены эксперименты по влиянию ЭМГПС на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2. В ходе исследования было показано, что ЭМГПС и рифампицин в концентрациях 10, 100 и 500 мкМ снижали проникновение аторвастатина в клетки НерG2 (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние ЭМГПС и рифампицина на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2 (нмоль/мг/мин; $M \pm SD$; $n=3$)

Концентрация вещества	Рифампицин	ЭМГПС
Контроль	4,78±0,49	
1 мкМ	4,52±0.13	3,96±0.62
10 мкМ	3,63±0.32*	3,39±0.31*
100 мкМ	3,39±0.35*	3,04±0.46*
500 мкМ	2,93±0.34*	2,35±0.31*

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями контроля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования была создана рекомбинантная линия клеток, селективно гиперэкспрессирующая OATP1B1, разработаны и валидированы ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения ЭМГП и аторвастатина в лизатах клеток.

Проникновение ЭМГП в клетки НЕК293 и НЕК293-OATP1B1 статистически не различалось, что говорит о том, что ЭМГП не является субстратом белка-транспортера OATP1B1.

Установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 1-500 мкМ дозозависимо ингибирует проникновение субстрата OATP1B1 аторвастатина в клетки, то есть является ингибитором функциональной активности OATP1B1, но по своей ингибирующей активности уступает рифампицину. Способность ЭМГПС ингибировать OATP1B1 была подтверждена и на клетках гепатоцеллюлярной карциномы НерG2, экспрессирующей основные транспортные белки гепатоцитов.

ЭМГПС во всех протестированных концентрациях при сроке инкубации 24ч повышает экспрессию гена *SLCO1B1* и не влияет на относительное количество OATP1B1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, ЭМГПС может длительно безопасно комбинироваться как с субстратами OATP1B1 (например, статинами), так и с ингибиторами транспортера (например, рифампицином) и не будет вызывать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная клеточная линия НЕК293-OATP1B1, селективно гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1, характеризуется следующими показателями транспорта 1 мкМ аторвастатина: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ, $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹.

2. Разработана методика оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 с помощью созданной рекомбинантной клеточной линии. Для тестирования веществ на принадлежность к субстратам транспортера сравнивают их проникновение в клетки НЕК293 и НЕК293-OATP1B1 в концентрациях 1 или 10 мкМ в течение 5 мин. Для тестирования на принадлежность к ингибиторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 анализируют влияние

изучаемых веществ на проникновение 1 мкМ аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 в течение 5 мин.

3. Разработанные и валидированные методики количественного определения аторвастатина и этилметилгидроксипиридина в лизате клеток с помощью ВЭЖХ-МС/МС являются высокочувствительными, а также соответствуют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, что делает целесообразным их использование для определения тестируемых веществ в образцах лизатов клеток в установленном диапазоне концентраций.

4. Установлено, что этилметилгидроксипиридин не является субстратом полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1, следовательно, не участвует в развитии межлекарственных взаимодействий с ингибиторами данного транспортера и может длительно безопасно назначаться с ними в комбинации.

5. Доказано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не влияет на относительное количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1, но ингибирует его активность со значением IC_{50} $12,1 \pm 7,64$ мкМ (на клетках линии НЕК293-ОАТР1В1) и IC_{50} $11,49 \pm 5,75$ мкМ (на клетках линии НерG2). Рассчитанные соотношения St_{max}/IC_{50} составили 0,032 и 0,034, что свидетельствует о том, что ингибирование ОАТР1В1 под действием этилметилгидроксипиридина сукцината не является клинически значимым, и данный препарат не участвует в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий с субстратами транспортера, что также позволяет длительно назначать его с ними в комбинации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработчикам лекарственных препаратов рекомендуется использовать созданную клеточную линию НЕК293-ОАТР1В1, селективно гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1, для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам данного транспортера.

2. Методики количественного определения этилметилгидроксипиридина и аторвастатина целесообразно использовать разработчикам лекарственных препаратов для анализа фармакокинетики при разработке дженерических препаратов, а также фармакокинетикам при проведении терапевтического лекарственного мониторинга.

3. Практикующим врачам-клиническим фармакологам можно безопасно комбинировать этилметилгидроксипиридина сукцинат с субстратами и ингибиторами транспортера OATP1B1, так как между ними не развиваются фармакокинетические межлекарственные взаимодействия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Технологию создания клеточной линии HEK293-OATP1B1, селективно гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы 1B1, целесообразно использовать для разработки аналогичных клеточных линий, селективно гиперэкспрессирующих клинически значимые белки-транспортеры.

Выявленная в данном исследовании способность этилметилгидроксипиридина сукцината ингибировать активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, требует дальнейшего уточнения, в частности, установления механизма ингибирования и сайтов связывания тестируемого вещества в молекуле транспортера.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК (К2)

1. **Ерохина, П.Д.** Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина в клетках линии HepG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / **П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, С.О. Ганина** [и др.] – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 2. – С. 149-158. – DOI 10.17816/PAVLOVJ100986. – EDN FFDFLP.

Публикации в рецензируемых научных изданиях, включенных в международные базы данных SCOPUS и Web of Science

2. **Ерохина, П.Д.** Линия клеток HepG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты / **П.Д. Ерохина, А.А. Слепнев, П.Ю. Мыльников** [и др.] – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 10(206). – С. 70-76. – DOI 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-70-76. – EDN MPLHQZ.
3. **Ерохина, П.Д.** Создание клеточной линии, селективно продуцирующей функционально активный транспортёр OATP1B1 / **М. С. Котлярова, А. В.**

Щулькин, П. Д. Ерохина [и др.] – Текст: непосредственный // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 9. – С. 1536-1544. – DOI 10.31857/S0320972523090063. – EDN WTOBBY.

4. **Ерохина, П.Д.** Влияние оригинальных отечественных нейротропных препаратов на полипептиды, транспортирующие органические анионы ОАТР1В1 и ОАТР1В3 / **П.Д. Ерохина**, Ю. В. Абаленихина, П. Ю. Мыльников [и др.] – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, № 8. – С. 198-203. – DOI 10.47056/0365-9615-2023-176-8-198-203. – EDN CVOVNV.
5. **Erokhina, P.D.** Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Is an Inhibitor but Not a Substrate of ABCB1 and SLCO1B1 / A.V. Shchulkin, **P.D. Erokhina**, A.V. Goncharenko [et al.]. – Text: visual // Pharmaceuticals (Basel). – 2023. – Vol. 16, N 11. – P. 1529–1543. – DOI 10.3390/ph16111529.

Работы, опубликованные в других изданиях

6. **Ерохина, П.Д.** Разработка клеточной линии гиперэкспрессирующей полипептид, транспортирующий органические анионы ОАТР1В1 / А. В. Петров, С. О. Ганина, Е. А. Коняхин, **П. Д. Ерохина** // Студенческий биохимический форум - 2023: Материалы III межвузовской студенческой конференции, Москва, 12–13 марта 2023 года. – Москва, 2023. – С. 35. – EDN MIRUUM.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЛР – нежелательные лекарственные реакции

ОАТР1В1 – полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1

ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат

С_{max} – максимальная концентрация

IC₅₀ – константа полумаксимального ингибирования

НЕК293 – клетки эмбриональной почки человека (англ.: human embryonic kidney)

HepG2 – клетки гепатоцеллюлярной карциномы (англ.: hepatocellular carcinoma)

SLCO1B1 – ген, кодирующий белок ОАТР1В1